

網羅的エピゲノムデータのモチーフ解析による miRNA の転写制御への関与の検討

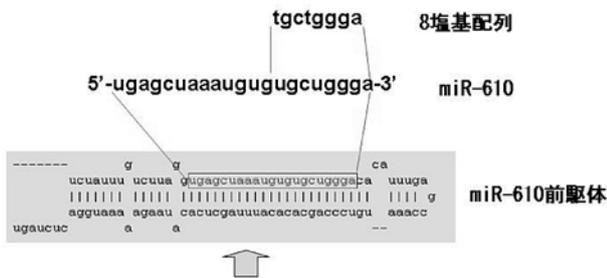
●畑田 出穂¹⁾ ◆堀居 拓郎¹⁾ ◆中井 謙太²⁾

1) 群馬大学生体調節研究所 2) 東京大学医科学研究所

<研究の目的と進め方>

我々はこれまでマイクロアレイを用いた DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法を用い、発生、癌などいくつかの系におけるメチル化の変化の解析してきた。またそれらのデータで DNA メチル化の変化した配列の特徴を探ってきた。その中で肺癌と正常肺との比較におき、癌で脱メチル化されている配列の近傍において tgctggga という配列が有意に多く、しかもこの配列は microRNA(miRNA) のひとつである miR-610 の 3' 側に末端の配列と一致していることがわかった。興味深いことにこの miR-610 をコードする前駆体の中で成熟した miRNA の部分がまったくバルジやミスマッチを含まず、siRNA のように完全に相補鎖と一致する珍しいものであることがわかった(図1)。また tgctggga 配列をすべての遺伝子の転写調節領域で調べたところセンス鎖に有意に多かった。

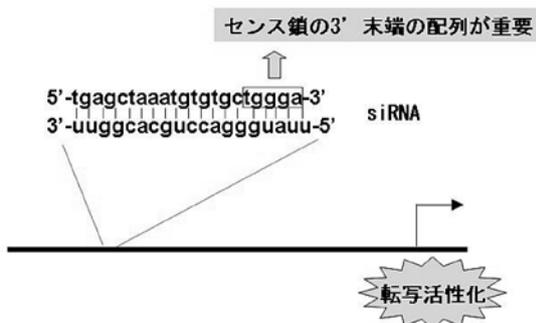
図1 癌で脱メチル化された領域に多い8塩基配列



バルジやミスマッチがまったくみられない siRNA 様 → 珍しい

ところで哺乳類で RNA interference(RNAi) 機構と転写の関係はあまりわかっていないが、最近、プロモーター配列に対する 21mer の 2 重鎖 RNA(dsRNA) を導入することにより転写活性化がおこる dsRNA-induced gene activation (RNAa) という現象が報告されている(図2)。

図2 RNAa



そこで我々は miR-610 が in vivo における RNAa に関与する転写制御 miRNA ではないかと考え、機能の検証をおこなう。

またこれとは別にメチル化される配列の特徴をさぐるため、MIAMI 法による解析の対象を広げて様々な系についておこないデータベース化し、モチーフ解析、機能の検証を進める。

<研究開始時の研究計画>

転写制御候補 miRNA の機能解析

転写制御候補 miRNA の候補である miR-610 を細胞に導入しレポーター実験、マイクロアレイを用いた機能解析をおこない miR-610 が遺伝子に転写制御に関わっているかどうかを検討する。

MIAMI 法による DNA メチル化の変化する配列のデータ収集

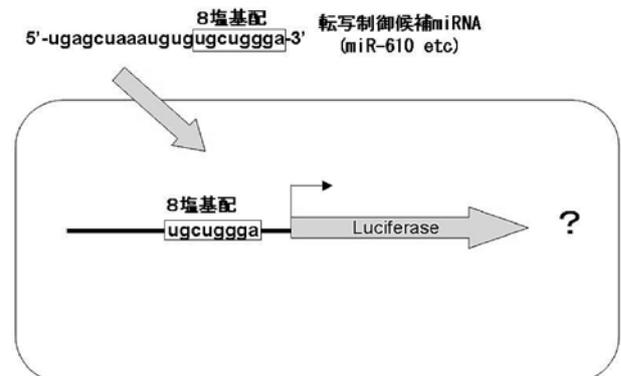
MIAMI 法による DNA メチル化の変化する配列のデータ収集：約 1 万 3 千の遺伝子の転写開始点から上流 6kb と下流 2kb にプローブを配置したマイクロアレイを用いて、様々な生命現象、疾患モデルマウスにおけるメチル化変化のプロファイルのデータを収集する。

<研究期間の成果>

転写制御候補 miRNA の機能解析

転写制御候補の miRNA である miR-610 を対応する 8 塩基のモチーフを転写調節領域にもつレポータープラスミド(あるいはモチーフに変異を導入したレポータープラスミド)と同時に細胞にトランスフェクションし、転写活性を検討した(図3)。8 塩基のモチーフを含む転写調節領域としては肺癌で脱メチル化されている

図3 転写制御候補 miRNA (miR-610) の転写活性化能のレポーター実験による検証



遺伝子である ASB18 を用い 293 細胞にトランスフェクションした。その結果、予想に反しまった転写の活性化はみられなかった。またレポーターの DNA メチル化についても COBRA 法で検討をおこなったが、まったくメチル化の変化はみられなかった。そこで今度は miR-610 を細胞に導入し、内在性の遺伝子に対する影響をマイクロアレイによる発現解析によりおこなった。そして

発現の活性化のみられた遺伝子の上流に8塩基のモチーフが多いかどうかの検討をおこなった。その結果、8塩基のモチーフは発現上昇している遺伝子に若干多く見られたが統計的に有意というほどではなかった。

miRNAが転写に関わっているかを検討

DNAメチル化の解析から転写への関与が示唆されていた、miR-610は今回転写に関与していないらしいことがわかった。そこでアプローチをかえてmiRNAが転写に関与するかどうかを検討した。具体的には転写開始点近傍にmiRNAと相補性をもつ遺伝子を数え上げ、転写開始点近傍にそのターゲットが有意に濃縮しているかどうかを調べた。(図4)。その結果、転写開始点上流でmiRNAとマッチする配列がランダムな配列と比べて有意に多いことがわかった(図5)。一方センス鎖とアンチセンス鎖との間でターゲットの出現頻度の差はなかった(図6)。

またこれらのmiRNAの中でmiR-663が最もそのターゲットが転写開始点近傍に多いことがわかった(図7)。miR-663は乳がんが発現が減少していることが報告されているが(Lehmann U et al. J Pathol. 2008;214(1):17-24)、ターゲットとなる転写開始点近傍領域をもつ遺伝子のオントロジー解析をおこなったところ、興味深いことにシグナル伝達やキナーゼといった遺伝子が有意に多かった(図8)。

図4 すべてのmiRNAについて全遺伝子の転写開始点上流配列とマッチする数を調べた

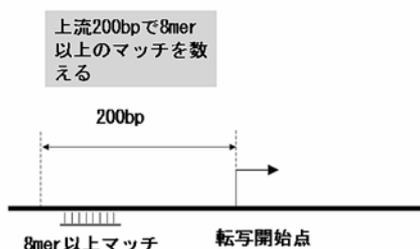


図5 転写開始点上流でmiRNAとマッチする配列がランダムな配列と比べて有意に多い

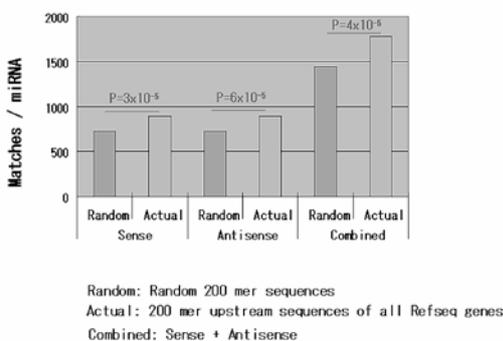


図6 センス鎖とアンチセンス鎖での差はない

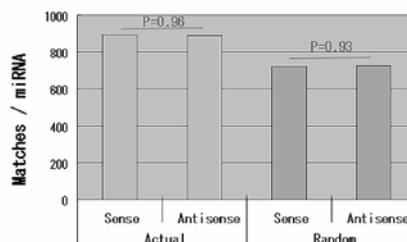


図7 miR-663は最もマッチする配列が多い

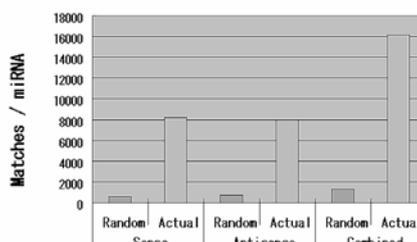


図8 miR-663のターゲットとなるプロモーターをもつ遺伝子のオントロジー解析

miR-663のターゲットとなる遺伝子に多い分類

Biological Process	P value
Signal transduction	4.72E-03

Molecular Function	P value
Kinase	9.56E-03

MIAMI法によるDNAメチル化の変化する配列のデータ収集

脂肪の分化のモデル系である3T3-L1細胞の分化誘導をはじめ、様々な系でMIAMI法を用いて網羅的DNAメチル化解析をおこなった。その結果、例えば3T3-L1細胞の分化においてArhgef19遺伝子の脱メチル化が重要な役割をなしていることなどがわかった。Arhgef19はRhoGEFの1つであり、高脂肪食における肥満マウスモデルにおいても発現変化がみられ、生活習慣病におけるエピジェネティクに変化をする遺伝子として興味深く今後の展開が期待される。

<国内外での成果の位置づけ>

DNAメチル化の変化を網羅的に解析したモチーフをmiRNAと関連づけ転写への関与の検討をおこなうアプローチはこれまでなされてこなかった。そういう意味で今回の検討は革新的な試みであったといえる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

今回、DNAメチル化と関連したmiRNAとによる転写への関与の検討からは残念ながら肯定的なデータを得ることはできなかった。これはmiR-610が転写に関与するという仮説自体が間違いであった可能性が考えられる。

<今後の課題、展望>

今回の結果からDNAメチル化と関連したmiRNAとによる転

写への関与の検討からは残念ながら肯定的なデータを得ることはできなかった。しかしながら転写調節領域に miRNA のターゲットとなる配列が優位に濃縮していることが解析からわかったことから、今後特に濃縮度が高かった miR-663 などの詳細な解析をおこなうことにより miRNA による転写制御の分子機構を明らかにしていくことができると期待する。

<研究期間の全成果公表リスト>

1. 705021622 (論文)

Hatada I, Emerging Technologies for Genome-wide DNA Methylation Profiling in Cancer., *Crit Rev Oncog.*, 12, 205-223(2006)

2. 705021624 (著書)

Hatada I, Genomic-wide DNA Methylation Profiling Methods-From RLGS to MIAMI, Progress in DNA Methylation Research, Nova Publishers, 2007

3. 801271614 (論文)

Nomura T, Kimura M, Horii T, Morita S, Soejima H, Kudo S, Hatada I, MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization., *Hum Mol Genet*, 2008 Apr 15;17(8):1192-1199

4. 801271617 (論文)

Hatada I, Morita S, Kimura M, Horii T, Yamashita R, Nakai K, Genome-wide demethylation during neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells., *J Hum Genet.*, 2008 53(2):185-191

5. 801271622 (論文)

Horii T, Kimura M, Morita S, Nagao Y, Hatada I., Loss of genomic imprinting in mouse parthenogenetic embryonic stem cells. *Stem Cells.*, 2008 Jan;26(1):79-88.

6. 0901031624 (論文)

Hatada I, Namihira M, Morita S, Kimura M, Horii T, Nakashima K. Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation. *PLoS ONE* 2008 Sep;3(9):e3189

7. 0903051750 (論文)

Morita S, Hara A, Kojima I, Horii T, Kimura M, Kitamura T, Ochiya T, Nakanishi, K, Matoba R, Matsubara K, Hatada I. Dicer is required for maintaining adult pancreas. *PLoS ONE.* 2009;4(1):e4212.